

模拟微重力条件下重组骨保护素融合蛋白 (rhOPG-HSA) 对破骨前体细胞 Raw264.7 抑制效应的研究

刘俊丽 宋淑军 司少艳 冯凯 刘军连 赵刚 张建中

中图分类号: R336 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2011)06-0467-04

摘要: 目的 探讨在模拟微重力 (Simulated microgravity, SMG) 条件下重组骨保护素融合蛋白 (rhOPG-HSA) 对破骨前体细胞 Raw264.7 的抑制效应。方法 在 SMG 条件下, 分别培养破骨前体细胞 Raw264.7 与成骨细胞 MC3T3-E1, 利用 ELISA 法检测 MC3T3-E1 细胞培养液中骨保护素活性, 用巨噬细胞集落刺激因子 (M-CSF) 以及可溶性破骨细胞分化因子 (sRANKL) 诱导 Raw264.7 分化为破骨细胞, 通过抗酒石酸酸性磷酸酶 (TRAP) 染色法鉴定 rhOPG-HSA 抑制破骨细胞能力, 利用半定量 RT-PCR 测定破骨细胞中 TRAP 的表达。结果 SMG 条件下, 骨保护素活性在 72 h 后显著降低 ($P < 0.01$); Raw264.7 细胞经 M-CSF 及 sRANKL 诱导 3、4、5 d 后, 与阴性对照组相比, TRAP 阳性染色的破骨细胞用 rhOPG-HSA 处理后明显减少 ($P < 0.05$), RT-PCR 测定结果表明破骨细胞 TRAP 的表达降低 ($P < 0.05$)。结论 SMG 条件下, rhOPG-HSA 能够抑制破骨前体细胞 Raw264.7 的分化。

关键词: 模拟微重力; 重组骨保护素融合蛋白; 破骨前体细胞; 抑制效应

Inhibitory effects of rhOPG-HSA on osteoclast precursor Raw264.7 cells under simulated microgravity LIU Junli, SONG Shujun, SI Shaoyan, et al. Department of Pathology and Experimental Medicine, the 306 Hospital of PLA, Beijing 100101, China

Corresponding author: ZHANG Jianzhong, Email: zhangjz55@sina.com

Abstract: **Objective** To investigate the inhibitory effect of recombinant human osteoprotegerin-human serum albumin fusion protein (rhOPG-HAS) on the osteoclast precursor Raw264.7 cells under the simulated microgravity (SMG). **Methods** Under the SMG condition, Raw264.7 cells and MC3T3-E1 cells were cultured. OPG activity in the MC3T3-E1 cell medium was detected with ELISA assay. Raw264.7 cells were induced to differentiate into osteoclasts by using macrophage colony stimulating factor (M-CSF) and soluble osteoclast differentiation factor (soluble receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, sRANKL). The inhibitory effect of rhOPG-HSA on osteoclasts was identified using tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining. Semi-quantitative RT-PCR was used to detect the expression of TRAP in the osteoclasts. **Results** Under the SMG condition, OPG activity decreased in 72h ($P < 0.01$). TRAP positive cells reduced significantly ($P < 0.05$) in rhOPG-HAS treated cultures, as compared with the negative control culture, in M-CSF and sRANKL induced Raw264.7 cells for 3d, 4d, and 5d. RT-PCR results showed that the expression of TRAP decreased in the osteoclasts. **Conclusion** Under the SMG condition, rhOPG-HSA inhibited differentiation of the osteoclast precursor Raw264.7 cells.

Key words: Simulated microgravity; rhOPG-HSA; Osteoclast precursor cells; Inhibitory effect

空间骨量丢失是中长期载人飞行中面临的主要

基金项目: 总装后勤部课题资助项目, 总后军队十二五重大项目, 总后军队十二五面上项目

作者单位: 100101 北京, 解放军第 306 医院

通讯作者: 张建中, Email: zhangjz55@sina.com

万方数据

病理生理问题, 骨密度以每月 1% 的速率持续丧失, 即使返回地球后这种现象依然存在^[1]。因此, 预防和治疗微重力相关的骨量损失是目前航天医学的热门课题之一。最近, 有学者报道, 微重力状态下, 成骨细胞内破骨细胞分化因子 (receptor activator of

nuclear factor- κ B ligand, RANKL) 和骨保护素 (osteoprotegerin, OPG) 含量比明显升高, 能够诱导破骨细胞的分化, 从而引起了骨吸收^[2]。研究表明, 含 OPG 分子的药物能有效地在微重力状态下保存骨质, 从而使 OPG 成为目前预防微重力相关的骨量损失的最有希望的药物之一^[3]。我们在前期的工作中构建了分泌表达的巴斯德毕赤酵母菌株^[4], 结果 rhOPG-HSA 获得了较高的表达^[5], 并成功表达纯化了重组骨保护素融合蛋白。在本项研究中我们采用骨髓单核细胞 Raw264.7 作为破骨前体细胞, 可溶性破骨细胞分化因子 (soluble receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, sRANKL)、巨噬细胞集落刺激因子 (macrophage colony stimulating factor, M-CSF) 为诱导剂, 进行模拟微重力 (simulated microgravity, SMG) 条件下 rhOPG-HSA 对骨髓单核细胞 Raw264.7 抑制效应的研究。

1 材料和方法

1.1 材料

骨髓单核细胞 Raw264.7, 成骨细胞 MC3T3-E1 本室保存。小鼠重组 sRANKL (PeproTech); 小鼠重组 M-CSF (PeproTech); 重组 rhOPG (PeproTech); DMEM 培养基 (Gibco); 优质胎牛血清 (Gibco); 胰蛋白酶 (Sigma); TRAP 染色试剂盒 (Sigma); 总 RNA 抽提试剂盒 (Invitrogen); 逆转录试剂盒 (Toyobo); 骨保护素活性检测试剂盒 (博士德生物工程公司)。

1.2 方法

1.2.1 Raw264.7 与 MC3T3-E1 细胞的常规培养与传代: 取冻存的骨髓单核细胞 Raw264.7, MC3T3-E1 细胞进行复苏, 用含 100 mL/L 胎牛血清和 100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素的 DMEM 在 37℃、5% CO₂ 及饱和湿度条件的恒温培养箱内培养, 根据生长情况定期传代, 采用第 3 次传代后 24 h 的细胞进行实验。

1.2.2 SMG 条件下 Raw264.7 与 MC3T3-E1 细胞的培养: 本实验采用双向多样本微重力效应模拟技术平台 (以下称回转器), 建立了模拟微重力骨髓单核细胞 Raw264.7、成骨细胞 MC3T3-E1 体外培养模型。先将玻片置于 6 孔板中, 以 2.0×10^5 个/玻片细胞密度接种玻片, 每个玻片 0.6 mL 细胞悬液, 将 6 孔板置于 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱培养 4 h, 每孔加 10% FBS 的 DMEM 培养基 2 mL 培养 24 h; 然后将容器中先加入培养基, 浸没支架, 用镊子将玻片固定在支架上, 每个容器 4 个玻片。补充细胞培养液

充满整个容器, 用 5 mL 注射器排净气泡, 封口膜密封容器口。最后将实验组容器安置在回转位置, 设定转速为 30 r/min, 对照组置于 37℃ 培养箱内培养。

1.2.3 细胞培养液中骨保护素活性检测: 按上述方法进行 MC3T3-E1 细胞的 SMG 条件的培养, 分别取对照组及回转组培养液, 置于真空冷冻干燥系统, 约经 3d 后液体被抽干; 然后以 2 mL 水重新溶解, 得到 20 倍 (40 mL/2 mL) 浓缩液, -20℃ 冻存或立即检测; 取骨保护素活性检测试剂盒, 按操作说明书检测。

1.2.4 SMG 条件下破骨细胞的诱导及鉴定: 骨髓单核细胞 Raw264.7 作为诱导破骨细胞的前体细胞。培养液中加入 25 ng/mL M-CSF 和 30 ng/mL 的 RANKL, 第 1 组为破骨细胞水平对照组, 第 2 组为 SMG 条件下破骨细胞空白阴性对照组, 第 3 组加入 500 ng/mL rhOPG-HSA。每组处理设 3 个重复。

按上述方法进行 Raw264.7 细胞的 SMG 条件下的培养, 诱导 3、4、5 d 后, 将贴有细胞的玻片取出固定, 按说明书进行 TRAP 染色, 光镜下观察, 以 TRAP (+) 多核细胞 (3 个或 3 个以上) 为破骨细胞。每个处理取 3 张玻片, 每张玻片在 40 倍光镜随机取 6 个视野进行破骨细胞计数。

1.2.5 RNA 提取和半定量逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR): 按上述方法进行 Raw264.7 细胞的模拟微重力条件的培养, 用总 RNA 抽提试剂盒按操作说明提取细胞总 RNA, 二乙基焦碳酸 (DEPC) 处理水溶解 RNA。在 Gene Amp 2400 PCR 扩增仪上进行 RT-PCR。取 0.5 μ g 总 RNA, 用逆转录试剂盒合成 cDNA, PCR 扩增 TRAP, 同时以 GAPDH 作为内参。引物序列及 PCR 扩增条件如下: TRAP 正向引物 5'-GCTGGAACCATGATCACCT-3', 反向引物 5'-TTGAGCCAGGACAGCTGAGT-3', 退火温度 57℃; PCR 产物为 245 bp。GAPDH 正向引物 5'-ATTCAACGGCAGCTCAAGG-3', 反向引物 5'-CTCCACGACATACTCAGCAC-3', 退火温度 55℃, PCR 产物为 221 bp。引物由上海生物工程有限公司合成。PCR 产物用 1.2% 琼脂糖电泳, 溴乙啶染色后于紫外灯下拍照。

1.2.6 统计学处理: 实验所得数据以均数 $\pm$ 标准差表示, 采用 SPSS 10.0 软件对计量数据进行方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 SMG 条件下成骨细胞 MC3T3-E1 分泌骨保护素活性的影响

为了明确成骨细胞 MC3T3-E1 分泌骨保护素在 SMG 条件下的表达变化, 分别将成骨细胞 MC3T3-E1 在水平条件, SMG 条件下培养 24、48、72 h, 真空冷冻干燥后, 然后用水重新溶解进行骨保护素 ELISA 检测。由图 1 可见, SMG 条件下骨保护素的吸光度值在 24、48 h 与 1g 水平对照相比, 变化不大, 在 72 h 后骨保护素的表达明显下降, 差异具有显著性意义 ($P < 0.01$), 表明随着培养时间的延长, SMG 条件下骨保护素的表达下降。

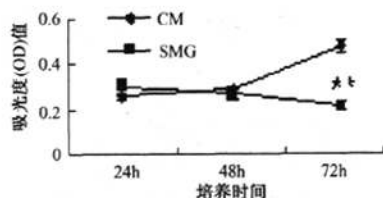


图 1 OPG₁₀₋₁₄ 对成骨细胞 MC3T3-E1 增殖的影响

CN: 正常对照; SMG: 模拟微重力

注: 与正常对照比较, * $P < 0.01$

2.2 SMG 条件下破骨细胞的诱导培养及鉴定

在倒置显微镜下连续 6d 观察 SMG 条件下培养的细胞, 发现骨髓单核细胞 Raw264.7 在 1~3 d 内细胞生长状态较好, 细胞呈长梭形, 胞体丰满, 胞浆均匀, 核圆; 培养液颜色粉红。培养 5 d 后骨髓单核细胞 Raw264.7 出现片状脱落, 死细胞逐渐增多, 而且细胞培养液颜色偏黄, 所以破骨细胞的诱导培养应控制在 5 d 内。骨髓单核细胞 Raw264.7 诱导 4 d 后, 将贴有细胞的玻片取出固定, 按说明书进行 TRAP 染色, 光镜下观察, 发现各组阳性破骨细胞胞浆中 TRAP 染色后呈玫瑰红色; 胞核酶活性低, 未染色, 呈阴性 (图 2)。SMG 条件下 TRAP 染色阳性破骨细胞与 1g 水平对照相比, 明显增多, 当用 rhOPG-HSA 处理后, 阳性破骨细胞明显减少。

2.3 SMG 条件下 rhOPG-HSA 抑制破骨细胞的形成

骨髓单核细胞 Raw264.7 分别诱导 3、4、5 d 后, 按说明书进行 TRAP 染色, 光镜下观察, 发现各组阳性破骨细胞较大, 胞浆中 TRAP 染色后呈玫瑰红色 (图 3)。随着培养时间的延长, rhOPG-HSA 组与 SMG 相比, TRAP 阳性多核细胞明显减少, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 与阳性对照组相比, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (图 4)。

2.4 SMG 条件下, rhOPG-HSA 抑制 TRAP mRNA 的表达

SMG 条件下, 骨髓单核细胞 Raw264.7 培养 3 d 后, 按说明书进行 RNA 提取, 并进行 RT-PCR 反应, 分析数据

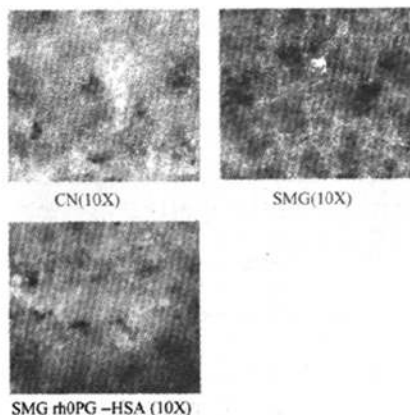


图 2 SMG 条件下 TRAP 染色阳性破骨细胞

CN: 正常对照; SMG: 模拟微重力

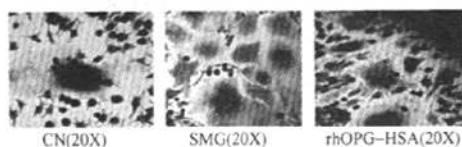


图 3 SMG 条件下破骨细胞培养 5 d 后

40x 显微镜下观察

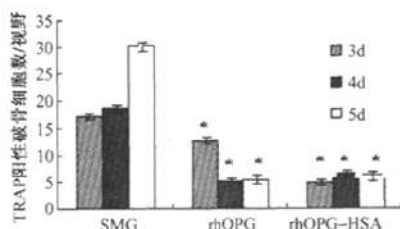


图 4 不同处理因素的 TRAP 阳性破骨细胞数

注: 与阴性对照比较, * $P < 0.05$

实验结果表明, 与正常对照相比, SMG 条件下, TRAP mRNA 的表达减弱, 当加入 rhOPG-HSA 后, TRAP mRNA 的表达被显著抑制 ($P < 0.05$) (图 5)。

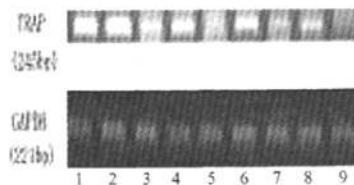


图 5 SMG 条件下, rhOPG-HSA 抑制

TRAP mRNA 的表达

1-3: CN; 4-6: SMG

3 讨论

3.1 微重力促使破骨细胞的生成, 进而发生骨吸收 Rucci 等^[6]研究了模拟微重力下成骨细胞调控

破骨细胞生成的效应,他们将鼠成骨原代培养物在单位重力或模拟微重力下在 NASA 开发的回转装置 (rotating wall vessel bioreactor) 内培养 24 h,发现成骨细胞在条件培养基受到微重力作用时促使鼠骨髓培养物内破骨细胞的生成和骨吸收。此外,Monici 等^[7]的研究进一步表明,模拟微重力可刺激破骨前体细胞 FLG29.1 发生分化及凋亡,与 1 g 条件相比,模拟回转装置内细胞骨架发生变化并且细胞凋亡数增加,并且存活的细胞显示出了类破骨细胞的形态,有过表达的破骨细胞标志及骨吸收能力,即使回到 1 g 条件下,RANK 及 RANKL 仍以自分泌及旁分泌的形式维持较高的分化水平,且 TRAP 多核细胞数比对照高 70%。本课题组的实验表明随着培养时间的延长,SMG 条件下骨保护素的表达下降,进一步验证了微重力促使破骨细胞的生成和骨吸收。

3.2 预防微重力相关的骨量丢失的药物筛选

骨重建是一个包括骨吸收和骨形成持续的过程,成骨细胞和破骨细胞的活动保持密切联系和动态的平衡^[8,9]。在航天飞行中,微重力相关的骨吸收和形成未耦联现象在绝经所造成的骨质疏松中并未发现^[10],破骨细胞介导的骨吸收已经显示出急剧增加,以及由此产生的骨质流失由钙的摄入量减少而加剧^[11]。至今已有许多措施被尝试用来对抗空间飞行中微重力引起的骨质丢失,保证足够的饮食摄入、或一定情况下保证足够的钙、VD、VK 和其他骨相关营养物质的摄入,但显然对于解决骨量丢失问题是不够的。

双膦酸盐是作为治疗骨质疏松药物的第一类批准用药,尽管美国航天局正在考虑将双膦酸盐作为抑制骨吸收药物的对抗措施,但由微重力引起的骨质疏松症的病因从根本上是与绝经后妇女形成的骨质疏松症有所不同^[12]。就其药理作用而言,双膦酸盐被认为是作为焦磷酸类似物,有助于维持骨量从而抑制破骨细胞介导的骨吸收,降低脊椎性和非脊椎性骨折的风险^[13]。应对航天飞行引起的骨质疏松症的安全和有效的措施要求减少执行飞行任务中引起骨折的潜在风险,确保宇航员长期飞行中的骨骼健康。最近,有学者^[14]对 ZOL (bisphosphonate zoledronic acid,双膦酸盐类药物)和 OPG 两种抗骨吸收药物进行了研究,发现最小相当剂量的 ZOL 和 OPG 能够最大限度地增加骨量,同时降低骨周转及矿化的有害影响。

我们利用前期工作中表达纯化的 rhOPG-HSA 进行了 SMG 条件下 rhOPG-HSA 对骨髓单核细胞 万方数据

Raw264.7 抑制效应的研究,发现 rhOPG-HSA 能够抑制破骨细胞的形成,但由于回转器条件所限,未能进行破骨细胞的骨吸收试验的检测。在今后的研究中,有待于利用尾吊动物模型在整体水平进一步研究 rhOPG-HSA 对微重力相关的骨量丢失的抑制效应。

【参考文献】

- [1] Collet P, Uebelhart D, Vico L, et al. Effects of 1- and 6-month spaceflight on bone mass and biochemistry in two humans. *Bone*, 1997;20:547-551.
- [2] Lang T, LeBlanc A, Evans H, et al. Cortical and trabecular bone mineral loss from the spine and hip in long-duration spaceflight. *J Bone Miner Res*, 2004,19:1006-1012.
- [3] Lloyd SA, Travis ND, Lu T, Bateman TA Development of a low-dose anti-resorptive drug regimen reveals synergistic suppression of bone formation when coupled with disuse. *J Appl Physiol*, 2008,104(3):729-38.
- [4] 刘俊丽,张建中,路浩军,等. rhOPG-HSA 融合蛋白分泌表达毕赤酵母菌株的构建. *军事医学科学院院刊*, 2009,33(4):318-321.
- [5] 刘俊丽,刘波,宋淑军,等. rhOPG179-HSA 在毕赤酵母菌中的表达. *生物技术通讯*, 2011,22(1):15-19.
- [6] Rucci N, Rufo A., et al. Modeled microgravity stimulates osteoclastogenesis and bone resorption by increasing osteoblast RANKL/OPG ratio. *J Cell Biochem*, 2007, 100(2): 464-473.
- [7] Monici M, Fusi F, Paglierani M, et al. Modeled gravitational unloading triggers differentiation and apoptosis in preosteoclastic cells. *J Cell Biochem*, 2006, 98:65-80.
- [8] Howard GA, Bottemiller BL, Turner RT, et al. Parathyroid hormone stimulates bone formation and resorption in organ culture: evidence for a coupling mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981,78: 3204-3208.
- [9] Martin TJ. Hormones in the coupling of bone resorption and formation. *Osteoporos Int*, 1993, Suppl 1: 121-125.
- [10] Smith SM, Wastney ME, O'Brien KO, et al. Bone markers, calcium metabolism, and calcium kinetics during extended-duration space flight on the mir space station. *J Bone Miner Res*, 2005,20: 208-218.
- [11] Smith SM, Wastney ME, Morukov BV, et al. Calcium metabolism before, during, and after a 3-mo spaceflight: kinetic and biochemical changes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 1999,277: R1-R10.
- [12] Gallagher JC. Role of estrogens in the management of postmenopausal bone loss. *Rheum Dis Clin North Am*, 2001 27: 143-162.
- [13] Fleisch HA. Bisphosphonates: preclinical aspects and use in osteoporosis. *Ann Med*, 1997,29: 55-62.
- [14] Lloyd SA, Travis ND, Lu T, et al. Development of a low-dose anti-resorptive drug regimen reveals synergistic suppression of bone formation when coupled with disuse. *J Appl Physiol*, 2008, 104(3):729-738.

(收稿日期:2011-04-20)